

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΟΛΙΤΗ ΞΑΝΘΗ

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CYP2A6 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ»**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

Ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου CYP2A6 σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- **Τζημαγιώργης Γεώργιος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, ΑΠΘ.
- **Κοντού Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Ζίφα Αιμιλία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.. Ολόψυχα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Τζημαγιώργη, Επίκουρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. που δέχτηκε να εκπονηθεί η παρούσα εργασία στο εργαστήριό του. Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της εργασίας, η καθοδήγηση και παρακολούθησή του, ήταν συνεχής και πολύτιμη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Κοντού Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, την κ. Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς και το σύλλογο των καθηγητών, που μου έδωσαν την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο της Βιολογικής χημείας της Ιατρικής του Α.Π.Θ..

Ευχαριστίες οφείλω στην κ. Νόρμα Βαβάτση, Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ.. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Χρήστο Καραγεωργόπουλο και την Κατερίνα Φράγκου για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την άψογη συνεργασία.

Περιεχόμενα

Περίληψη	
Abstract	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
Καρκίνος	
Καρκίνος του πνεύμονα	
Τύποι καρκίνου του πνεύμονα	
Αίτια καρκίνου του πνεύμονα	
Γενετικός πολυμορφισμός	
Σύστημα κυτοχρώματος P-450	
Γονίδια CYP	
Πολυμορφισμοί του γονιδίου CYP2A6	
Συσχέτιση πολυμορφισμών του CYP2A6 με τον καρκίνο του πνεύμονα	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
Προέλευση δειγμάτων	
Εργαστηριακός εξοπλισμός	
Χημικά διαλύματα	
Μέθοδοι μοριακής βιολογίας	
Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων	
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς	
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα	
PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	
Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA	
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
Ενίσχυση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο της PCR	
Έλεγχος των PCR προϊόντων σε πηκτή αгарόζης	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

Περίληψη

Σκοπός: Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται παγκοσμίως και πλήττει τόσο τους άντρες όσο και τις γυναίκες. Η εμφάνιση της νόσου οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε επιγενετικούς παράγοντες. Το κάπνισμα λόγω των τοξικών και καρκινικών ουσιών που περιέχει ο καπνός των τσιγάρων, αποτελεί τον βασικό αιτιολογικό παράγον της νόσου. Η αποτοξίνωση του οργανισμού από ξενοβιοτικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών του καπνού, πραγματοποιείται κυρίως από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P₄₅₀ σε 2 φάσεις. Πολυμορφισμοί των γονιδίων των ενζύμων αυτών έχουν αξιολογηθεί ως ικανοί παράγοντες που θα μπορούσαν να μεταβάλλουν την πιθανότητα ενός ατόμου να εμφανίσει καρκίνο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και μελέτη γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου CYP2A6 σε δείγματα από καρκίνο του πνεύμονα στον ελληνικό πληθυσμό.

Μέθοδος: Με τη μέθοδο της PCR εξετάστηκαν 37 δείγματα με καρκίνο του πνεύμονα καθώς και 27 δείγματα από υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Αποτελέσματα: Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού CYP2A6*2 με την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Εντοπίστηκε μονάχα ένα ομόζυγο για το αλληλόμορφο στα υγιή δείγματα και ένα ετερόζυγο στα δείγματα με καρκίνο του πνεύμονα.

Abstract

Purpose: Lung cancer is one of the most significant health problems in both sexes worldwide. Genetic, as well as epigenetic factors influence lung cancer development. Tobacco smoke is unquestionably the most important causative factor. The majority of chemical carcinogens, included those of tobacco smoke, require metabolic activation before they interact with cellular macromolecules and can cause cancer initiation. The xenobiotic-metabolising machinery contains two main types of enzymes: the phase-I cytochromes P-450 (CYP) and phase-II enzymes. Polymorphisms in the CYP genes have been considered as potential modifiers of individual's cancer risk. The aim of this project was the determination and study of genetic polymorphisms of the CYP2A6 gene in Greek patients.

Methods: A PCR methodology was used to analyze 37 specimens from patients with lung cancer and 27 from healthy individuals (controls).

Results: According to the results, there is no association between CYP2A6*2 polymorphism and lung cancer. We detected only one CYP2A6*2 genotype in normal samples and one heterozygous wF/mut genotype in lung cancer samples.

Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και παιδιά (Alberg et al., 2003).

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μια και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων που ονομάζεται όγκος.

Κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι τα εξής:

- αντίσταση στην απόπτωση
- πολλαπλασιασμός παρουσία ή μη αυξητικών παραγόντων
- αντίσταση σε σήματα που σταματούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- αντίσταση στο μηχανισμό γήρανσης
- μετάσταση
- δημιουργία αγγείων για την αιμάτωσή τους (Kufe et al., 2003).

Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μία από τις πλέον συνήθεις μορφές κακοήθειας, με την εμφάνισή της να πλήττει κυρίως τα άτομα της μέσης και τρίτης ηλικίας. Πειράματα και έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ τις τελευταίες δεκαετίες έδειξαν ότι το κάπνισμα είναι ο κυριότερος εξωγενής παράγοντας που αυξάνει τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Δυστυχώς ο ολοένα αυξανόμενος αριθμός των γυναικών που καπνίζουν οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των γυναικών που προσβάλλονται από καρκίνο του πνεύμονα (Beckett Ws).

Στην Ελλάδα ο καρκίνος του πνεύμονα είναι το συχνότερο είδος καρκίνου στους άνδρες, ενώ στις γυναίκες παρουσιάζεται με όλο και αυξανόμενους ρυθμούς τα τελευταία χρόνια. Το αποτέλεσμα είναι να κατέβει πλέον στη δεύτερη θέση σε σειρά προσβολής, έπειτα από εκείνον του μαστού. Υπολογίζεται ότι ο πνευμονικός καρκίνος ευθύνεται για το 35% των θανάτων από καρκινικά αίτια στους άνδρες και για το 25% στις γυναίκες. Επίσης εκτιμάται ότι προκαλεί περισσότερους θανάτους από όσους όλοι μαζί, οι καρκίνοι του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη. Το 60% των ασθενών στους οποίους διαγιγνώσκεται καρκίνος του πνεύμονα, πεθαίνει μέσα στο επόμενο έτος.

Πίνακας 1:

Αριθμοί νέων περιστατικών και θανάτων στα διάφορα είδη καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες (American Cancer Society, 2012).

Αριθμός νέων περιπτώσεων			
ΑΝΔΡΕΣ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ	
Προστάτης	241,740 (29%)	Στήθος	226,870 (29%)
Πνεύμονες και βρόγχοι	116,470 (14%)	Πνεύμονες και βρόγχοι	109,690 (14%)
Κόλον και παχύ έντερο	73,420 (9%)	Κόλον και παχύ έντερο	70,040 (9%)
Ουροδόχος κύστη	55,600 (7%)	Τράχηλος της μήτρας	47,130 (6%)
Μελάνωμα	44,250 (5%)	Θυρεοειδής	43,210 (5%)
Νεφρά	10,250 (5%)	Μελάνωμα	32,000 (4%)
Λέμφωμα Non-Hodgkin	38,160 (4%)	Λέμφωμα Non-Hodgkin	31,970 (4%)
Κακοήγη νεοπλ. στοματικής κοιλότητας	28,540 (3%)	Νεφρά	24,520 (3%)
Λευχαιμία	26,830 (3%)	Ωοθήκες	22,280 (3%)
Πάγκρεας	22,090 (3%)	Πάγκρεας	21,830 (3%)
Σύνολο	848,170(100%)	Σύνολο	790,740 (100%)

Αριθμός θανάτων			
ΑΝΔΡΕΣ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ	
Πνεύμονες και βρόγχοι	87.750 (29%)	Πνεύμονες και βρόγχοι	72.590 (26%)
Προστάτης	28.170 (9%)	Στήθος	39.510 (14%)
Κόλον και παχύ έντερο	26.470 (9%)	Κόλον και παχύ έντερο	25.220 (9%)
Πάγκρεας	18.850 (6%)	Πάγκρεας	18.540 (7%)
Συκώτι και ηπατικός χολικός πόρος	13.980 (5%)	Ωοθήκες	15.500 (6%)
Λευχαιμία	13.500 (4%)	Λευχαιμία	10.040 (4%)
Οισοφάγος	12.040 (4%)	Λέμφωμα Non-Hodgkin	8.620 (3%)
Ουροδόχος κύστη	10.510 (3%)	Τράχηλος της μήτρας	8.010 (3%)
Λέμφωμα Non-Hodgkin	10.20 (3%)	Συκώτι και ηπατικός χολικός πόρος	6.570 (2%)
Νεφρά	8.650 (3%)	Εγκέφαλος και υπόλοιπο νευρικό σύστημα	5.980 (2%)
Σύνολο	301.820 (100%)	Σύνολο	275,370 (100%)

Τύποι Καρκίνου του Πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα, γνωστός και ως βρογχογενές καρκίνωμα, μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους: ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC) και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στην εικόνα των καρκινικών κυττάρων, όταν τα παρατηρούμε με το μικροσκόπιο. Οι δύο αυτοί τύποι του καρκίνου του πνεύμονα αναπτύσσονται και εξαπλώνονται με διαφορετικό τρόπο και ενδεχομένως να απαιτούν και διαφορετική θεραπευτική αγωγή. Επομένως, η διάκριση κρίνεται αναγκαία.

Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αντιστοιχεί στο 20% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Είναι η πιο επιθετική μορφή και αναπτύσσεται ταχύτατα. Είναι άμεσα συνδεδεμένος με το κάπνισμα ενώ μόνο το 1% των ασθενών τυγχάνει να είναι μη-καπνιστές. Η μετάστασή του πραγματοποιείται ταχύτατα σε πολλά μέρη του ανθρώπινου σώματος ενώ συνήθως διαγιγνώσκεται εφόσον έχει εξαπλωθεί εκτενώς.

Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC)

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου του πνεύμονα και αντιστοιχεί στο 80% όλων των περιπτώσεων. Βάσει της μορφής των καρκινικών κυττάρων που σχηματίζονται μπορούμε να διακρίνουμε τρεις υποτύπους:

1. Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma): Είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα και αντιστοιχεί στο 50% των περιπτώσεων του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ενώ το αδενοκαρκίνωμα σχετίζεται με το κάπνισμα, ο τύπος αυτός παρατηρείται ακόμη και σε ασθενείς που δεν έχουν υπάρξει ποτέ καπνιστές. Τα αδενοκαρκινικά κύτταρα εμφανίζονται κυρίως στις εξωτερικές ή περιφερειακές περιοχές των πνευμόνων.

2. Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma): Παλαιότερα ήταν η πιο κοινή μορφή καρκίνου του πνεύμονα και παρατηρούνταν πιο συχνά απ' ό

αδενοκαρκίνωμα. Στις μέρες μας ευθύνεται για το 30% των περιπτώσεων. Είναι γνωστό και ως επιδερμοειδές καρκίνωμα και εμφανίζεται κυρίως στην κεντρική περιοχή των βρόγχων.

3. Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma): Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για περιπτώσεις μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα που δεν ανήκουν ούτε στα αδενοκαρκινώματα ούτε στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα και είναι η λιγότερο κοινή μορφή (Johnson DH et al., 2008).

Εικόνα 1. Οι 2 τύποι καρκίνου του πνεύμονα, μικροκυτταρικός καρκίνος και μη μικροκυτταρικός.

Αίτια καρκίνου του πνεύμονα

- **Κάπνισμα:** το κάπνισμα (ενεργητικό αλλά και παθητικό) είναι ο βασικός αιτιολογικός παράγων της νόσου, με το 80-85% των πασχόντων από καρκίνο στον πνεύμονα να είναι καπνιστές. Σε χώρες με παρατεταμένη χρήση τσιγάρων π.χ. ΗΠΑ, το ποσοστό περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα που οφείλεται στο κάπνισμα φτάνει το 90%. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει περισσότερες από 7000 χημικές ουσίες, πολλές από τις οποίες είναι τοξικές. Τουλάχιστον 70 από τις ουσίες αυτές έχει αποδειχθεί ότι είναι καρκινογόνες για τον άνθρωπο ή τα ζώα. Σε σχεδόν 9 στους 10 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, υπάρχει άμεση σχέση εμ το κάπνισμα. Μεγάλο ρόλο στη συσχέτιση αυτή παίζει ο αριθμός των τσιγάρων που καπνίζονται ημερησίως, αλλά και τα συνολικά έτη καπνίσματος. Ένας καπνιστής αυξάνει κατά 30 φορές την πιθανότητά του να ασθενήσει σε σχέση με έναν μη καπνιστή. Ακόμη, υπολογίστηκε ότι ένα στα επτά άτομα που καπνίζουν πάνω από δύο πακέτα την ημέρα, θα πεθάνει τελικά από τη νόσο. Έρευνες επίσης έχουν δείξει ότι κάθε χρόνο στις ΗΠΑ πεθαίνουν 3.000 άνθρωποι από καρκίνο στον πνεύμονα, οι οποίοι δεν είχαν καπνίσει ποτέ, εξαιτίας του παθητικού καπνίσματος. Η κατάσταση μάλιστα είναι παρόμοια για τους καπνιστές πούρου ή πίπας. Η διακοπή της βλαβερής αυτής συνήθειας μειώνει εντυπωσιακά την πιθανότητα νόσησης. Το κάπνισμα προκαλεί επίσης τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, μια παθολογική κατάσταση, η οποία αυξάνει από 4 έως 6 φορές περισσότερο την πιθανότητα να προσβληθούν οι ασθενείς στη συνέχεια και από καρκίνο (Alberg et al).
- Συχνή έκθεση σε παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο του πνεύμονα όπως:
- **Ραδόνιο:** το ραδόνιο είναι ορυκτό που προέρχεται από τους βράχους και τη σκόνη και μπορεί να παγιδευτεί στα σπίτια και τα κτίρια. Δεν είναι ορατό, δεν έχει γεύση ούτε μυρωδιά. Σύμφωνα με έρευνες, το ραδόνιο ευθύνεται για περίπου 20.000 περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα ετησίως, γεγονός που το καθιστά δεύτερο στους αιτιολογικούς παράγοντες της νόσου. Στις ΗΠΑ έχει εκτιμηθεί πως 1 στα 15 σπίτια έχει πολύ υψηλή συγκέντρωση ραδονίου.

- **Ραδιενεργός ακτινοβολία** (ακόμη και για θεραπευτικούς σκοπούς), δηλητηριώδεις ενώσεις όπως το αρσενικό ή το χρώμιο, αναθυμιάσεις, προϊόντα καύσης, εξατμίσεις και καυσαέρια (Boffetta).
- **Οικογενειακό ιστορικό:** Όπως όλα τα είδη του καρκίνου, έτσι και ο καρκίνος του πνεύμονα έχει σαφές γενετικό υπόβαθρο. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η γενετική αυτή ευαισθησία συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη ενός γονιδίου γνωστό ως RGS17. Το γονίδιο αυτό, το οποίο βρίσκεται στον βραχίονα του χρωμοσώματος, υπερεκφράζεται σε καρκινικούς ιστούς. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, αν κάποιος καπνιστής έχει συγγενή πρώτου βαθμού που προσβλήθηκε από καρκίνο του πνεύμονα, έχει 17-25% πιθανότητα να νοσήσει κάποια στιγμή και ο ίδιος (Schwartz AG et al, 2006) (You M et al, 2009).
- **Διατροφή:** δίαιτα φτωχή σε καροτίνη και βιταμίνες Α και Β, σε συνδυασμό με χρήση τσιγάρου, αυξάνει τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.
- **Ηλικία:** Κάποιο ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα παίζει και η ηλικία. Άνθρωποι με ηλικία άνω των 70 ετών παρουσιάζουν σε συχνότητα 300 φορές μεγαλύτερη από εκείνους κάτω των 30, τη νόσο αυτή, ενώ ο μέσος όρος διάγνωσης είναι η ηλικία των 71 χρόνων.

Γενετικός πολυμορφισμός

Γενετικός πολυμορφισμός ονομάζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων γενετικά καθορισμένων εναλλακτικών γονοτύπων σ' έναν πληθυσμό σε τέτοια συχνότητα ώστε ο σπανιότερος δεν θα μπορούσε να διατηρηθεί μόνο με αλληπάλληλες μεταλλάξεις. Κατά τη διάρκεια της μεταβίβασης και της μετάφρασης της γενετικής πληροφορίας μπορεί να συμβεί ένας αριθμός μεταλλάξεων που έχει σχέση είτε με τη σωστή αντιγραφή του γενετικού μηνύματος είτε με τη σωστή μεταγραφή του. Τα λάθη αυτά έχουν άμεσο αντίκτυπο στη σωστή αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA, που με τη σειρά της επηρεάζει τη σωστή αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο RNA, η οποία τέλος καθορίζει τη σωστή αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Ο γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μια κωδική περιοχή ενός γονιδίου, μπορεί όμως να εντοπισθεί και σε περιοχές DNA που δεν εμπλέκονται στην διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης. Στην πρώτη περίπτωση, μια απλή αντικατάσταση βάσης μπορεί να οδηγήσει σε τοποθέτηση διαφορετικού αμινοξέους με αποτέλεσμα την αλλοίωση της πρωτεΐνης και της λειτουργικότητάς της. Η αλλαγή βάσης θα μπορούσε επίσης να προκαλέσει και τη δημιουργία κωδικονίου λήξης, οπότε η πρωτεΐνη θα ήταν ελλιπής. (E.B. Ford, 1940)

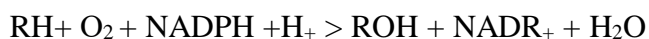
Αλλαγή στη δομή κάποιου γονιδίου, που έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή στη σωστή λειτουργία του, μπορεί να οδηγήσει σε κάποιο γενετικό νόσημα. Μικρές, ουδέτερες αλλαγές στη δομή των γονιδίων (πολυμορφισμοί) που δεν προκαλούν αλλαγή στη σωστή λειτουργία τους, είναι πολύ συχνές και σε αυτές οφείλονται πολλά από τα χαρακτηριστικά μας, όπως το χρώμα των μαλλιών και των ματιών μας. Οι πολυμορφισμοί δεν προκαλούν κάποιο γενετικό νόσημα, μπορεί όμως να σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση σε κάποιο από τα νοσήματα αυτά.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κάπνισμα κατέχει κύρια θέση στην κατηγορία των εξωγενών παραγόντων που αυξάνουν τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλές χημικές ουσίες, πολλές από τις οποίες είναι καρκινογόνες. Τα περισσότερα καρκινογόνα του καπνού χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση. Ο μεταβολισμός των ουσιών αυτών πραγματοποιείται από τα ένζυμα της φάσης I μπορεί να μεταβολίσουν ως τελικά καρκινογόνα. Τα ένζυμα της φάσης II οδηγούν στην εξουδετέρωση και την

απέκκριση των τελικών καρκινογόνων. Αρκετά από τα γονίδια που εμπλέκονται στις δύο φάσεις του μεταβολισμού έχουν πρόσφατα απομονωθεί και αναγνωρισθεί. Πολλά από αυτά παρουσιάζουν πολυμορφισμούς. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων αυτών έχουν θεωρηθεί ως ικανοί παράγοντες που θα μπορούσαν να μεταβάλλουν την πιθανότητα ενός ατόμου να εμφανίσει καρκίνο του πνεύμονα. (Hannu Rannio et al., 1995)

Το σύστημα του κυτοχρώματος p-450

Το σύστημα του κυτοχρώματος p-450 έχει σαν κύρια λειτουργία την αποτοξίνωση των φυσικών και χημικών προϊόντων, στα οποία περιλαμβάνονται και φυτικά προϊόντα, κάποια από τα οποία λειτουργούν και σαν φάρμακα. Είναι ένας από τους κύριους δρόμους στο μεταβολισμό. Το κυτόχρωμα P-450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων, τα οποία παίζουν τον κύριο ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών. Σήμερα έχουν βρεθεί αρκετές δεκάδες διαφορετικών ενζύμων της ομάδας του κυτοχρώματος P-450 με εξειδίκευση για διαφορετικές ουσίες και συνεχώς βρίσκονται και άλλα. Τα ένζυμα αυτά είναι αιμοπρωτεΐνες, οι οποίες παίζουν το ρόλο του μεταφορές ηλεκτρολυτών μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή NADPH στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας το υπόστρωμα που είναι η ξενοβιοτική ουσία. Στην πραγματικότητα και η ξενοβιοτική ουσία και τα NADH ή NADPH οξειδώνονται ενώ το οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Για το λόγο αυτό, το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος λέγεται και οξείδωση μικτού τύπου. Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε μια τυχαία ουσία^{RH} είναι η εξής: Guengerich F.P., 2008)



Εικόνα 2:

Μια γενική εικόνα της συνολικής αντίδρασης

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του P-450 είναι ότι μπορεί να επαχθεί και να ανασταλεί από ορισμένες ουσίες. Η επαγωγή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στη μάζα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο φαίνεται από την αύξηση του βάρους του ήπατος του οργανισμού που δέχτηκε την επαγωγή. Τέτοιου είδους επαγωγή μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα αντοχής στο μεταβολισμό, όπου κάτι τέτοιο ορίζεται κάποια ουσία. Βέβαια μιας και τα ένζυμα αυτά δεν δείχνουν εξειδίκευση για κάποια συγκεκριμένη ουσία, μπορεί να συνυπάρχει αντοχή στο μεταβολισμό και άλλων ουσιών. Αντιστολή μπορεί να συμβεί είτε λόγω ανταγωνισμού της δέσμευσης της ουσίας στο ένζυμο, είτε λόγω αδρανοποίησης της δράσης του ενζύμου από χημική παρεμπόδιση ή μείωση του ρυθμού σύνθεσης του ενζύμου (Ortiz de Montellano, et. al., 2005)

Τα γονίδια CYP

Τα γονίδια Cyp είναι 57 και ταξινομούνται σε 18 οικογένειες και 43 υπο-οικογένειες (Nelson D., 2003).

Πίνακας 2. Η ταξινόμηση των Cyp γονιδίων.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
CYP1	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2C2, CYP2P1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1
CYP3	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP4	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP5	CYP5A1
CYP7	CYP7A1, CYP7B1
CYP8	CYP8A1, CYP8B1
CYP11	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP17	CYP17A1
CYP19	CYP19A1

CYP20	CYP20A1
CYP21	CYP21A2
CYP24	CYP24A1
CYP26	CYP26A1. CYP26B1. CYP26C1
CYP27	CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1
CTP39	CYP39A1
CYP46	CYP46A1
CYP51	CYP51A1

Γονίδιο CYP2A6

Το γονίδιο CYP2A6 ανήκει στην υποοικογένεια CYP2A και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10p13.2. Αποτελείται από 9 εξόνια και 8 ιντρόνια και το μήκος του είναι περίπου 6kb. Το CYP2A6 γονίδιο εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο συκώτι και σε μικρότερο στη ρινική βλέννα και το αναπνευστικό σύστημα. Το mRNA μετάγραφο που κωδικοποιεί υπάρχει επίσης σε κάποια κύτταρα των πνευμόνων. (Fernandez- Salquero et al. 1995)

Εικόνα 3: Το γονίδιο CYP2A6 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19.

Εικόνα 4: Τρισδιάστατη δομή του ενζύμου CYP2A6

Οι πρωτεΐνες του CYP2A6 είναι μονοξυγενάσες και καταβολίζουν ποικίλες ουσίες, οι οποίες μπορεί να διακριθούν σε τοξικές και φαρμακευτικές. Οι περισσότερες από τις ουσίες αυτές αποτοξινώνονται ενώ κάποιες άλλες ενεργοποιούνται. Το CYP2A6 είναι το κύριο ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την οξείδωση της νικοτίνης και του μεταβολισμού της κουμαρίνης. Επίσης, το CYP2A6 εμπλέκεται στην μεταβολική ενεργοποίηση προκαρκινογόνων όπως οι νιτροαψίνες, κύρια συστατικά του καπνού των τσιγάρων. Η ενεργοποίηση αυτή θεωρείται ως ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκεται στη χημική καρκινογένεση του καρκίνου του πνεύμονα. (Pattern et al., 1997) (Nakajima et al., 1996)

Εικόνα 5: Μεταβολικά μονοπάτια της κουμαρίνης και ο ρόλος του CYP2A6

Εικόνα 6: Ο ρόλος του CYP2A6 στο μεταβολικό μονοπάτι της νικοτίνης. (Berkman et al., 1995)

Πολυμορφισμοί του γονιδίου CYP2A6

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γονίδιο CYP2A6 κατέχει σημαντική θέση στον μεταβολισμό γνωστών τοξικών ουσιών και καρκινογόνων που υπάρχουν στον καπνό του τσιγάρου. Πρόσφατες έρευνες έχουν οδηγηθεί στο συμπέρασμα ότι γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου CYP2A6 μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξάρτηση και κατανάλωση καπνού όπως επίσης και στην πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, αφού στις περιπτώσεις αυτές ο μεταβολισμός της νικοτίνης και κουμαρίνης δεν είναι αποτελεσματικός. (Pianezza et al., 1998)

Οι σημαντικότεροι πολυμορφισμοί του γονιδίου όπως και η συχνότητα εμφάνισης τους σε 4 πληθυσμούς αναφέρονται στο πίνακα 3.

Πίνακας 3: Πολυμορφισμοί του CYP2A6.

Αλληλόμορφο	Ευρωπαίοι- Αμερικάνοι	Αφρο- Αμερικάνοι	Κορεάτες	Ιάπωνες
CYP2A6*1	84.5 (n=316)	74.4 (n=262)	53.3 (n=223)	45.1 (n=83)
CYP2A6*1X2	0	0	0.2 (n=1)	0
CYP2A6*2	1.1 (n=4)	0.3 (n=1)	0	0
CYP2A6*3	0	0	0	0
CYP2A6*4A	0	0.6 (n=2)	10.8 (n=45)	19.0 (n=35)
CYP2A6*4D	0	0.3 (n=1)	0	0
CYP2A6*5	0	0	0.5 (n=2)	0
CYP2A6*6	0	0	0	0
CYP2A6*7	0	0	9.8 (n=41)	9.8 (n=18)
CYP2A6*8	0	0	1.2 (n=5)	1.1 (n=2)
CYP2A6*9	8.0 (n=30)	8.5 (n=30)	19.6 (n=82)	19.0 (n=35)
CYP2A6*10	0	0	1.0 (n=3)	2.2 (n=4)
CYP2A6*11	0	0	0.7 (n=3)	0.5 (n=1)
CYP2A6*12	0	0	0	0

CYP2A6*13	0	0	0.2 (n=1)	1.1 (n=2)
CYP2A6*14	3.5 (n=13)	1.4 (n=5)	0	0
CYP2A6*15	0	0	1.2 (n=5)	2.2 (n=4)
CYP2A6*16	0.3 (n=1)	1.7 (n=6)	0	0
CYP2A6*17	0	10.5 (n=37)	0	0
CYP2A6*18	2.1 (n=8)	0	0.5 (n=2)	0
CYP2A6*19	0	0	1.0 (n=4)	0
CYP2A6*20	0	1.7 (n=6)	0	0
CYP2A6*21	0.5 (n=2)	0.6 (n=2)	0	0
CYP2A6*22	0	0	0	0
Συνολικός αριθμός αλληλόμορφων	(n=374)	(n=352)	(n=418)	(n=184)

Συσχέτιση πολυμορφισμού του CYP2A6 με προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα

Η συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων του CYP2A6 και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα έχει εξεταστεί σε διάφορες μελέτες. Μελέτες σε Αμερικάνικους και Ασιατικούς πληθυσμούς έδειξαν συσχέτιση μεταξύ των παρατηρούμενων μεταλλάξεων και του καρκίνου του πνεύμονα. Αντίθετα, καμία απολύτως συσχέτιση δεν εντοπίστηκε σε Καυκάσιους πληθυσμούς.

Πίνακας: Συσχέτιση μεταλλάξεων του CYP2A6 και καρκίνου του πνεύμονα.

Πληθυσμός	Συσχέτιση	Βιβλιογραφία
Αμερικάνοι	NAI	London et al, 1999
Ασιάτες	NAI	Miyamoto et al, 1999
Ασιάτες	NAI	Kamataki et al, 1999
Καυκάσιοι	OXI	Loviot et al, 2000
Ασιάτες	OXI	Tan et al, 2000
Καυκάσιοι	OXI	Gulsten et al

Ενίσχυση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο της PCR

Για την ενίσχυση του γονιδίου CYP2A6 χρησιμοποιήθηκαν 150-200 ng γονιδιωματικού DNA και η διαδικασία ολοκληρώθηκε σε δύο στάδια. Το προϊόν της PCR I χρησιμοποιήθηκε στο δεύτερο στάδιο, δηλαδή στην PCR II.

Κάθε σωληνάκι για την PCR I, με τελικό όγκο 25 µl, περιείχε τα εξής:

Διάλυμα	Όγκος
10 X PCR Buffer (τελ. 1X)	2,5 µl
50 mM MgCl ₂ (τελ. 1,2 ml)	0,6 µl
25 mM dNTPs (τελ. 0,2 ml)	0,2 µl
2A6-ex1F Primer	1,0 µl
2A6-ex4R Primer	1,0 µl
ddH ₂ O	18,45 µl
0,6 U Taq DNA polymerase	0,25 µl
150 ng DNA	~ 1,0 µl
Σύνολο	25,0 µl

Το ζεύγος εκκινητών είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές αλληλουχίες:

forward primer: 5'-GCTGAA CAC AGA GCA GAT GTA CA-3'

reverse primer: 5'-GGA GGT TGA CGT GAA CTG GAA GA-3'

Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf PCR Machine) για την διεξαγωγή των αντιδράσεων ενίσχυσης του γενετικού υλικού. Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας του κυκλοποιητή είναι οι εξής:

1. Μετουσίωση (Denaturation): 95° C για 1 min.
2. Μετουσίωση (Denaturation): 95° C για 15 sec.
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 60° C για 20 sec.
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72° C για 3 min.
5. Επιστροφή στο σήμα 2 και επανάληψη 35 κύκλων.
6. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72° C για 7 min.

Στη συνέχεια, τα δείγματα φυλάσσονταν στους 4° C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

Τα προϊόντα της πρώτης PCR, χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο στάδιο.

Στη συνέχεια ακολούθησε το 2^ο στάδιο. Για τις αντιδράσεις της PCRII χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα της PCRII χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα αντίδρασης της PCR I.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τις παρακάτω νουκλεοτιδικές αλληλουχίες:

Cyp2A6wt: 5'-CTC ATC GAC GCC CT-3'

Cyp2A6mut: 5'-CTC ATC GAC GCC CA-3'

E3Ra: 5'-TCG TCC TGG GTG TTT TCC TTC-3'

Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν κατά ζεύγη.

1^ο ζεύγος: Cyp2A6wt και E3Ra

2^ο ζεύγος: Cyp2A6mut και E3Ra

Κάθε σωληνάκι PCR είχε τελικό όγκο 25 µl και περιείχε τα εξής:

1^ο ζεύγος ⇒

Διάλυμα	Όγκος
10 x PCR Buffer (τελ.1X)	2,5 µl
MgCl ₂ 50mM (τελ. 1 ml)	0,5 µl
25 mM dNTPs (τελ. 0,1 ml)	0,1 µl
Cyp2A6wt Primer	1,0 µl
E ₃ Ra Primer	1,0 µl
ddH ₂ O	18,85 µl
0,3 U Taq DNA polymerase	0,25 µl
DNA	0,8 µl
Σύνολο	25,0 µl

2^ο ζεύγος ⇒

Διάλυμα	Όγκος
10 x PCR Buffer (τελ.1X)	2,5 µl
MgCl ₂ 50mM (τελ. 1,5 ml)	0,75 µl
25 mM dNTPs (τελ. 0,1 ml)	0,1 µl
Cyp2A6mut Primer	2,0 µl
E ₃ Ra Primer	2,0 µl
ddH ₂ O	15,8 µl
0,3 U Taq DNA polymerase	0,25 µl
DNA	1,6 µl
Σύνολο	25,0 µl

Ομοίως οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf PCR Machine) για την διεξαγωγή των αντιδράσεων ενίσχυσης του γενετικού υλικού. Το αναμενόμενο PCR προϊόν είχε μέγεθος περίπου 100 bp. Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας του κυκλοποιητή ήταν οι εξής:

1. Μετουσίωση (Denaturation): 95° C για 1 min.
2. Μετουσίωση (Denaturation): 95° C για 15 sec.
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 50° C για 20 sec.
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72° C για 45 sec.
5. Επιστροφή στο σήμα 2 και επανάληψη 16 κύκλων.

Έλεγχος PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR II υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε έλεγχο με τη μέθοδο της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε TBE. Οι ηλεκτροφορήσεις διεξήχθησαν υπό τάση ~ 80 V και ένταση ρεύματος ~ 110 mA.

Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνταν 12 µl (PCR II δείγματα το οποίο αναμειγνυόταν με 3 µl κατάλληλου διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer). Μετά τη φόρτωση όλων των προϊόντων στο πήκτωμα, ακολουθούσε προσθήκη 5 µl κατάλληλου δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρονταν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για την ανάγνωση, φωτογράφιση και εκτύπωση των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα

Η παρούσα μελέτη για την ύπαρξη του πολυμορφισμού CyP2A6*2 πραγματοποιήθηκε σε 37 δείγματα με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και σε 27 φυσιολογικά δείγματα (μάρτυρες) με τη μέθοδο της PCR.

Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR αναμένουμε την εμφάνιση ενός τμήματος DNA μεγέθους περίπου 100 bp. Οι περιπτώσεις ομοζυγωτίας για το φυσιολογικό αλληλόμορφο χαρακτηρίστηκαν ως +/+, οι περιπτώσεις ετεροζυγωτίας ως +/- και οι περιπτώσεις ομοζυγωτίας για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ως -/-. Χαρακτηριστικές εικόνες PCR ενισχύσεων του γονιδίου Cyq2A6*2 τόσο σε καρκινικά δείγματα όσο και σε φυσιολογικά παρατηρούμε στις επόμενες εικόνες.

Εικόνα : Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων από καρκινικά δείγματα έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου Cyp2A6. Κ (καρκινικό δείγμα) L (Ladder 100bp).

Εικόνα : Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων από δείγματα υγιών ατόμων έπειτα από ενίσχυση του γονιδίου Cyq2A6. N (υγιές δείγμα), L (Ladder 100 bq).

Πίνακας : Συγκεντρωτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης 37 καρκινικών δειγμάτων για τον πολυμορφισμό CYP2A6*2.

Α.Α.	Πολυμορφισμός CYP2A6*2-Γενότυποι
1 K	
2 K	
3 K	
4 K	
5 K	
6 K	
7 K	
8 K	
9 K	
10 K	
11 K	
12 K	
13 K	
14 K	
15 K	
16 K	
17 K	
18 K	
19 K	
20 K	
21 K	
22 K	
23 K	
24 K	
25 K	
26 K	
27 K	
28 K	
29 K	
30 K	
31 K	
32 K	
33 K	
34 K	
35 K	
36 K	
37 K	

Πίνακας: Συγκεντρωτική παρουσίαση αποτελεσμάτων ανάλυσης 27 φυσιολογικών δειγμάτων για τον πολυμορφισμό CYP2A6*2.

Α.Α. δειγμάτων	Γενότυποι για τον πολυμορφισμό CYP2A6*2
1 N	
2 N	
3 N	
4 N	
5 N	
6 N	
7 N	
8 N	
9 N	
10 N	
11 N	
12 N	
13 N	
14 N	
15 N	
16 N	
17 N	
18 N	
19 N	
20 N	
21 N	
22 N	
23 N	
24 N	
25 N	
26 N	
27 N	

Παρατηρώντας τα δεδομένα των παραπάνω πινάκων διαπιστώνουμε πως κανένα από τα άτομα με καρκίνο του πνεύμονα δεν παρουσιάζει το ομόζυγο αλληλόμορφο CYP2A6*2 = (CYP2A6/2/*2). Ο ετερόζυγος γενότυπος CYP2A6*1/2 υπάρχει σ' ένα από τα καρκινικά αυτά δείγματα. Στην περίπτωση των φυσιολογικών δειγμάτων παρατηρείται ένας ομόζυγος γενότυπος CYP2A6/2/*2 ενώ όλα τα υπόλοιπα παρουσιάζουν τον ομόζυγο άγριο γενότυπο CYP2A6*1/*1.

Συζήτηση

Η διερεύνηση του ρόλου που παίζουν ορισμένοι πολυμορφισμοί γονιδίων, υπεύθυνα για την μεταβολική ενεργοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών, στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα, έχει απασχολήσει έως σήμερα πάρα πολλές ερευνητικές προσπάθειες. Τα αποτελέσματα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τη σχέση του CYP2A6*2 πολυμορφισμού και την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα είναι θετικά για Αμερικάνικους και Ασιατικούς πληθυσμούς και αρνητικά για Καυκάσιους.

Στην παρούσα εργασία, που αφορά σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα στον ελληνικό πληθυσμό, εξετάστηκαν 37 δείγματα καρκίνου του πνεύμονα και 27 φυσιολογικά. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την παρουσία του αλληλόμορφου cyp2a6*2/*2 σε φυσιολογικά δείγματα σε ποσοστό 3,7% (1/27) και του ετερόζυγου CYP2A6*1/*2 σε καρκινικά κύτταρα σε ποσοστό 2,7% (1/37). Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με έρευνες σε Καυκάσιους πληθυσμούς που δείχνουν πως δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα και πολυμορφισμών του CYP2A6 γονιδίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberg Antony J. PhD, MPH and Jonathan M. Samet MD, MJ (2003). Epidemiology of Lung Cancer. Chest. 1993; 103: 215-495.
- Alberg Antony J, Jean G. Ford and Jonathan M. Samet. Epidemiology of Lung Cancer. Chest 2007; 132:295-55S.
- Beckett Ws. Epidemiology and etiology of lung cancer. Clin Chest Med. 1993; 14(1):1-15.
- Berkman CE, Park SB, Wrighton SA and Cashman JR (1995). In vitro – in vivo correlations of human (s)-nicotine metabolism. Biochem Pharmacol so: 565-570.
- Baffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. Oncogene 2004; 23(38): 6392-6403.
- E.G. Ford 1965. Genetic Polymorphism.
- Fernandez - Salguero P, Hoffman SMG, Cholerton S, Mohrenweiser H, Raunio H, Rantio A, Pelkonen O, Huang J, Evans WE, Idle JR and Gonzalez FJ (1995). A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A6 genes and identification of variant CYP2A6 alleles. Am J Hum. Genet 57: 651-660.
- Guengerich F.P. Cytochrome P₄₅₀ and chemical toxicology. Chem. Res. Toxicol. 21 (1): 70-83.
- Gulsten Harriet (2000). Significance of polymorphisms in CYP2A6 gene.
- Hannu Raunio, Kirsti Husgafuel-Pursiainen, Sisko Anttila, Eino Hictanen, Ari Hirvonen and Olavi Pelkonen. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility. Gene, 159 (1995) 113-121.
- Johnson DH, Blot WJ, Canbone DP, et al. Cancer of the lung: non-smal cell lung cancer and small cell lung cancer. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, Mckena WG. Clinical Oncology. 4th ed Philadelphia Pa: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
- Kamataki T, Nunoya K, Sakai Y, Kushida H and Fujita K. Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. Mutat Res 1999; 428:125-130.

- Kufe et al, (2003): Cancer Medicine. 6th Edition Frei III, Emil, editors BC Decker Inc. Canada.
- London SJ, Idle JR, Daly AK, Coetzee GA. Genetic variation of CYP2A6 smoking and risk of cancer. *Lancet* 1999; 353: 898-899.
- Loriot Ma, Rebuissou S, Oscarson M, Cene'e S, Miyamoto M and Ariyoshi N et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P₄₅₀2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics* 2001; 11:39-44.
- Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H. et al. CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 658-660.
- Nelson D. (2003). Cytochromes P₄₅₀ in humans.
- Ortiz de Montellano, Paul R. (2005). Cytochrome P₄₅₀ : structure, mechanism and biochemistry (3rd ed.).
- Pattern CJ, Smith TJ, Friesen MJ, Tynes RE, Yang CS, Murphy SE. Evidence for cytochrome P₄₅₀-2A6 and 3A₄ as major catalysts for N'-nitrosonornicotine alpha-hydroxylation by human liver microsomes carcinogenesis 1997; 18:1623-1630.
- Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature* 1998; 393: 750. 750.
- Schwartz AG, Ruckdeschel JC. Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir. Crit. Care Med.* 2006 Jan 1, 173(1): 16-22.
- Tan W, Chen G-F, Song C-Y, Yang M and Kadlubar FF (2000). CYP2A6 gene deletion and susceptibility to lung and esophageal cancer in a Chinese population. AACR 91th Annual Meeting, San Francisco.
- Yamano S, Tatsuno J and Gonzalez FJ (1990). The CYP2A6 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry* 29:1322-1329.
- Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich F.P. and Shimada T. (1992). Cytochrome P₄₅₀E₁ and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13: 1789-1794.

You M, Wang D, Liu P, Vikis H, James M, Lu Y, Wang Y, Wang M, Chen A, Jia D, Liu Y, Wen W, Yang D, Sun Z, Pinney SM, Zheng W, Shu XO, Long J, Gao YT, Xiang YB, Chow WH, Rothman N, Peterson GM de Andrade M, Wu Y, Cunningham JM, Wiest JS, Fain PR, Schwartz AG, Girard L, Gardar A, Gaba C, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Lee J, Kupert E, Seminara D, Minna J, Bailey Wilson JE, Amos C1, Anderson MW. Fine mapping of chromosome 6q23-25 region in familial lung cancer families reveals RGS17 as a likely candidate gene. Clin. Cancer Res, 2009. Apr. 15;15(8): 2666-74.